

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

AE

(11)Publication number : 06-279296

(43)Date of publication of application : 04.10.1994

(51)Int.Cl.

A61K 35/16  
A61K 37/04  
A61K 39/395  
B01D 61/14

(21)Application number : 05-089466

(71)Applicant : ASAHI CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 25.03.1993

(72)Inventor : FUJITA NOBUTSUGU  
ISHIKAWA HAJIME

## (54) REMOVAL OF ASSOCIATED PROTEIN FROM PLASMA FRACTION PREPARATION

### (57)Abstract:

PURPOSE: To remove associated proteins from plasma fraction preparation where as it was impossible until now, this method enables secured and rapid removal while keeping a high recovery of proteins by a relatively simple method.

CONSTITUTION: Associated proteins contained in a preparation are removed by filtering an immunoglobulin preparation for intravenous injection and a fractionated albumin preparation through a porous high polymer membrane having 10 to 30nm average pore diameter.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

24.02.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-279296

(43)公開日 平成 6 年(1994)10月 4 日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 35/16		7431-4C		
37/04		8314-4C		
39/395	X	9284-4C		
B 0 1 D 61/14	5 0 0	8014-4D		

審査請求 未請求 請求項の数 6 F D (全 4 頁)

(21)出願番号 特願平5-89466

(22)出願日 平成 5 年(1993) 3 月25日

(71)出願人 000000033

旭化成工業株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜 1 丁目 2 番 6 号

(72)発明者 藤田 修嗣

宮崎県延岡市旭町 6 丁目4100番地 旭化成工業株式会社内

(72)発明者 石川 元

東京都千代田区有楽町 1 丁目 1 番 2 号 旭化成工業株式会社内

(74)代理人 弁理士 清水 猛 (外 2 名)

(54)【発明の名称】 血漿分画製剤中から蛋白質会合物の除去方法

(57)【要約】

【目的】 従来の技術では達成できない血漿分画製剤からの蛋白質会合物除去を、蛋白質の回収率を高い状態に保ちつつ、確実かつ迅速に比較的簡便な操作で行う方法を提供する。

【構成】 静脈注射用免疫グロブリン製剤および分画アルブミン製剤を、平均孔径が10~30nmである多孔質性の高分子膜を用いて濾過することによって、製剤中に含まれる蛋白質会合物を除去する方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 血漿分画製剤を平均孔径が10～30nmである多孔質性的高分子膜で濾過することを特徴とする血漿分画製剤中から蛋白質会合物の除去方法。

【請求項2】 血漿分画製剤が静脈注射用免疫グロブリン製剤であり、多孔質性的高分子膜の平均孔径が10～20nmである請求項1に記載の免疫グロブリン会合物の除去方法。

【請求項3】 血漿分画製剤が分画アルブミン製剤であり、多孔質性的高分子膜の平均孔径が10～20nmである請求項1に記載のアルブミン会合物の除去方法。

【請求項4】 多孔質性的高分子膜が銅アンモニア法再生セルロースを素材とするウィルス除去性的高分子膜である請求項1ないし3のいずれかに記載の蛋白質会合物の除去方法。

【請求項5】 細胞培養により得られた蛋白質製剤を平均孔径が10～30nmである多孔質性的高分子膜で濾過することを特徴とする細胞培養により得られた蛋白質製剤から蛋白質会合物の除去方法。

【請求項6】 多孔質性的高分子膜が銅アンモニア法再生セルロースを素材とするウィルス除去性的高分子膜である請求項5に記載の蛋白質会合物の除去方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、血漿分画製剤中から蛋白質の会合物を除去する方法に関するものである。さらに詳しくは、主に静脈注射用免疫グロブリン製剤および分画アルブミン製剤から蛋白質の会合物を有用な蛋白質とは別に分離する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 蛋白質溶液中には、複数の蛋白質分子が非共有結合で結合した会合物が存在している。この会合物は、蛋白質の不可逆的な変性によって生じており、一般に容易に解離させることができない。さらに、この会合物は互いに凝集して、より大きな会合物を作る傾向があり、溶液中に白濁や沈殿を生じることもある。

【0003】 また、生体の免疫力を担う免疫グロブリンは、蛋白質、菌、ウィルス等を核としてその周囲に結合し、抗原抗体複合体と呼ばれる巨大な蛋白質会合物を形成する。

【0004】 蛋白質を主たる成分とする血漿や血漿分画製剤、あるいは細胞培養医薬品中に存在する蛋白質会合物は、製剤を人体に静脈注射した際に人体に現われる副作用の原因のひとつとされている。

【0005】 例えば、静脈注射用免疫グロブリンの場合、チアノーゼや血圧低下などのショック様反応や、呼吸困難などの気道症状、さらに皮疹等が、免疫グロブリン会合物を原因として起こるといわれている。

【0006】 それ故に、これら会合物を溶液中から除去する方法は、従来から数多く考案されている。例えば、

多孔質性担体ゲルによるクロマトグラフィー法や、化学的処理法、吸着剤の添加等である。

【0007】 しかし、クロマトグラフィー法の場合、かなりの会合物除去効果は得られるものの、大量の溶液を処理することはできず、作業に要する時間も長大になる。

【0008】 また、化学的処理方法は大量処理は可能であるが、処理に用いた薬品を溶液から除去する必要があり、さらには、処理によって有用蛋白質の失活や変性を招きやすく、有用蛋白質の回収率を低下させることとなる。

【0009】 吸着剤の添加による方法は、会合物の除去効率が高いとはいえず、さらに、化学的処理と同様に吸着剤の除去という作業が必要となる。

【0010】 さらに、ポリスルホン樹脂より製膜された限外濾過膜で濾過することによるグロブリン会合物の除去方法（特公昭62-3815）も考案されているが、この方法実施後の蛋白質の回収率は40%前後と極めて低く、また、濾過速度、濾過容量ともに低く、工業的な有効性が高いとはいえない。

【0011】 また、血液から血漿を分離するための膜を用いても、グロブリン会合物が除去できるともされている（特開昭61-69732）が、この膜による除去効果は、会合物と孔の大きさの關係に起因するのではなく、膜素材と会合物との相互作用力による会合物の膜表面への吸着によるものであると考えられるため、吸着を起こさせ得る条件（例えば、溶液のpHやイオン強度）で使用する必要が生じ、わずかな条件の変化で期待される除去効果を得られないことが多い。

【0012】 加えて、これら従来の方法では、作業中に菌やウィルス等の微生物が外部から溶液中に混入する危険性が高い。医薬品の場合、特にこのことは重大であるので、会合物除去の処理をした蛋白質溶液に対して、これら微生物を不活化または除去する作業が必要となっている。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、従来の技術では達成できない血漿分画製剤からの蛋白質会合物除去を、蛋白質の回収率を高い状態に保ちつつ、確実かつ迅速に比較的簡便な操作で行う方法を提供する。ここで言う高い蛋白質回収率とは70%以上、好ましくは80%以上であることを指す。

【0014】

【課題を解決するための手段】 本発明は、血漿分画製剤である静脈注射用免疫グロブリンや血清アルブミンの水溶液を蛋白質性的高分子膜で濾過し、蛋白質会合物を含まない溶液として回収する方法である。

【0015】 本発明は、平均孔径が10～30nmである多孔質性的高分子膜を用いて行われる。

【0016】 膜の平均孔径は特に重要である。現在でも

除去すべき会合物の正確な大きさは不明であるため、除去に適切な平均孔径が存在するかどうか不明である。ところが、本発明者らは、平均孔径を異にする一連の多孔質性高分子膜による会合物の除去性能を検討した結果、会合物の大きさが20～30nmというほぼ一定の領域内に分布していることを見だし、本発明に至った。したがって、平均孔径が30nmを越えて大きすぎる場合、蛋白質会合物は膜を透過してしまい、目的は達成され得なくなる。逆に平均孔径が10nm以下のように小さすぎると、蛋白質の単分子さえも膜を透過することができないため、このような平均孔径を有する膜を使用することはできないのである。

【0017】膜の多孔質性とは、膜の一方の面から他方の面に貫通した孔が、膜面に無数に開口した状態を言う。この場合、孔は必ずしも直状の管として膜を貫通している必要はなく、膜の内部で屈曲していてもよい。また、いくつかの孔が膜の内部で融合していたり、逆にひとつの孔が枝分かれしていてもよく、これらが混在していてもよい。

【0018】また、平均孔径とは、膜を貫通する孔の膜全体としての平均的な管径を、孔の直断面を円として近似したときの直径として表記される。このような平均孔径は、膜を通過する液体の透過量を測定することにより、間接的に計算することができる。

【0019】なお、本発明において、高分子膜としては中空糸状、平膜状、チューブ状等、種々の形状を用いることができるが、体積に比して濾過有効膜面積の大きい中空糸状が有効である。

【0020】さらに、本発明において、使用される高分子膜の素材としては特に限定されるものではなく、有機高分子、無機高分子のいずれであってもよい。ただし、有用蛋白質の回収率を高くするためには、蛋白質を吸着しやすい性質のあるものや、接触することによって蛋白質を変性せしめる素材は除外することが望ましい。その意味において、蛋白質の透過性および非変性性に優れた銅アンモニア法再生セルロースは好適な素材である。

【0021】該再生セルロースを素材とする膜のうち、特にウイルス除去性銅アンモニア法再生セルロース膜がさらに好適である。この膜で濾過することにより、蛋白質会合物のみでなくウイルス等の微生物をも効率よく除去することができる。

【0022】このような高分子膜を用いて蛋白質溶液を濾過すると、溶液中の蛋白質のうち会合して大きな粒子となったものは、高分子膜の孔を通過することができず、高分子膜の溶液が流入する方の表面ないしは高分子膜中の孔の部分に捕捉される。一方、蛋白質のうち会合していないものは、高分子膜の孔を通過できるので、濾過された溶液中に回収される。かくして蛋白質溶液から蛋白質会合物は除去される。

【0023】

【実施例】

（実施例1）膜を通過する透過水量から求めた平均孔径が15nmである銅アンモニア法再生セルロースからなる有効膜面積3.5cm<sup>2</sup>の中空糸膜を準備した。該膜の製膜は特開昭61-254202号および特開昭61-274707号によった。

【0024】一方、ウシ血漿由来のγグロブリン乾燥粉末を0.9%の塩化ナトリウムを含む20mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.4）に0.1%溶解したものを、蛋白質溶液として準備した。

【0025】この蛋白質溶液4mlを、上記の中空糸膜で蛋白質溶液に0.27kgf/cm<sup>2</sup>の空気圧を加えることにより濾過した。なお、濾過に要した時間は170分であった。

【0026】このようにして濾過された蛋白質溶液を高速液体クロマトグラフィーにより分析して、各会合数の会合物の回収率を求めたところ、表1に示すとおり3分子以上のγグロブリンより成る会合物が除去されていた。なお、蛋白質の単分子の量には変化がなかった。

【0027】

【表1】

	γグロブリンの会合数		
	1分子	2分子	3分子以上
蛋白質の回収率	99.6%	100%	7.7%

（実施例2および比較例1）平均孔径がそれぞれ15nm、35nm、40nm、75nmである銅アンモニア法再生セルロースからなる有効膜面積0.7cm<sup>2</sup>の中空糸膜を、実施例1と同様に準備した。

【0028】次に、ヒト由来の血清アルブミンを生理的濃度の食塩水に1%溶解した液を準備し、これを上記の膜でそれぞれ0.15mlずつ濾過した。なお、濾過時の空気圧は0.27kgf/cm<sup>2</sup>であった。

【0029】得られた濾液に含まれる蛋白質をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した結果を図1に示す。aは濾過前のアルブミン液、b～eは順に孔の大きさが75nm、40nm、35nm、15nmである膜で濾過を行った後の液を分析したものである。

【0030】図1の3つのバンドのうち、①は3分子以上、②は2分子のアルブミンから成る会合物であり、③は1分子のアルブミンに相当する。平均孔径が15nm

である膜による濾過を行うと、3分子以上の会合物が完全に除去できることが明らかである。このとき、会合していないアルブミンの量には全く変化がない。一方、平均孔径が35nmである孔を有する膜で濾過を行っても、3分子以上の会合物は全く除去できていなかった。  
 (比較例2) 実施例1と同様の操作を平均孔径8nmの

膜を用いて行った。  
 【0031】この時、表2に示すとおりγ-グロブリン単分子の回収率は約55%であった。  
 【0032】  
 【表2】

	γ-グロブリンの会合数		
	1分子	2分子	3分子以上
蛋白質の回収率	54.7%	23.3%	0.0%

【0033】  
 【発明の効果】本発明を実施することにより、血漿分画製剤から蛋白質会合物を除去することが可能となる。  
 【0034】本発明は、蛋白質溶液を高分子膜で濾過するだけであるので、従来の方法に比べてきわめて簡易な作業として実行できる。また、本発明では、蛋白質会合物が除去される以外は溶液の組成を全く変化させないで処理することが可能であるので、添加薬品の除去等の作業を付け加えて行う必要がない。加えて、蛋白質に何らの物理的、化学的な作用を加えないので、有用蛋白質の失活を伴うこともない。  
 【0035】さらに、本発明では、高分子膜およびそれ

に付随する器具(膜の支持構造物および溶液を移送する配管等)と溶液を回収する容器に無菌性が保たれていれば、本発明で適用される高分子膜の微細な孔を、菌類はもちろんそれよりも小さいウィルス(現在知られている最小のウィルスの粒子径は約20nmである)でさえも、高分子膜によって除去されてしまうため、回収された溶液にこれら微生物の不活化および除去等の作業を行う必要もない。  
 【図面の簡単な説明】  
 【図1】実施例2および比較例1で得られた濾液に含まれる蛋白質をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した結果を示す図表である。

【図1】

